

ETUDE DE LA REACTIVITE MICROBIOLOGIQUE ET DE L'EFFET TOXIQUE SUR *CARASSIUS AURATUS* DU GLUTARALDEHYDE

Djadi Amina
Ait-Amar Hamid

Laboratoire des Sciences de Génie des Procédés Industriels,
Faculté de Génie des Mécaniques et de Génie des Procédés,
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Algérie

Bouzid Mohammed

Unité de recherche: Matériels, Processus et Environnement,
Université M'Hamed Bougara Boumerdes, Algérie

Abstract

Glutaraldehyde is widely used in industry as an effective biocide. The hospital hygiene uses it in large quantities due to its physicochemical properties (reactivity, vapor pressure). However, glutaraldehyde proves toxic to human and animal health. The study of the glutaraldehyde effects on “*Carassius auratus* family of cyprinadae freshwater” highlights the extreme nuisance of glutaraldehyde on the environment and the lethal concentration (LC₅₀) determined by the weight of goldfish, emphasizes the harmfulness of glutaraldehyde-based solutions.

Keywords: Glutaraldehyde, *Carassius auratus*, Ecotoxicity, Reactivity, LC₅₀

Résumé

Le “glutaraldéhyde” est un composé largement utilisé dans l’industrie, comme biocide efficace. L’hygiène hospitalière l’utilise en grande quantité, pour ses propriétés physicochimiques (réactivité, tension de vapeur). Le “glutaraldéhyde” se montre toxique pour la santé humaine et animale. L’étude des effets du “glutaraldéhyde” sur le *Carassius auratus*, de la famille des cyprinadae d’eaux douces, met en évidence son extrême nuisance sur l’environnement. La Concentration Létale (CL₅₀) déterminée en fonction du poids de “cyprin doré”, souligne la nocivité des solutions à base du glutaraldéhyde.

Mots clés: Glutaraldéhyde, *Carassius auratus*, Ecotoxicité, Réactivité, CL₅₀.

Introduction

Le Glutaraldéhyde est une molécule hautement réactive (Bouزيد et al., 2013; Monsan et al., 1975; Russell and Hopwood, 1976; Jayakrishnan and Jameela, 1996). Les groupes carbonyles réagissent avec les groupements amines (Migneault et al., 2004; Okuda et al., 1991), en inhibant les fonctions vitales des micro-organismes (Sano et al., 2005). Le 1,5 dipentanal, est utilisé en tant que biocide dans de nombreuses applications industrielles et notamment dans les hôpitaux, pour la désinfection à froid des instruments médicaux (Le Fol and Vaillant, 2009; Sano et al., 2003; Power and Russell, 1988). En solution aqueuse, le glutaraldéhyde est volatil, légèrement acide, relativement stable (Bonnard et al., 2010). Il est classé comme toxique par la directive 67/548/CE, Règlement CE n°1272/2008. Par contre, la classification de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économique), le présente comme toxique dans les systèmes aquatiques. Le glutaraldéhyde a été détecté dans les effluents hospitaliers à des concentrations comprise entre 0,5 et 3,72 mg par litre (Jolibois, 2002).

Pour Leung (2001), le rejet de glutaraldéhyde en concentration excessive dans le réseau d'assainissement urbain peut inhiber l'action des microorganismes. Il peut compromettre les performances du traitement biologique des stations d'épuration. Il peut de même générer des résistances. Peu de travaux sont consacrés à l'écotoxicité du glutaraldéhyde vis-à-vis des organismes aquatiques (Russell and Hopwood, 1976; Le Fol and Vaillant, 2009). En effet, le glutaraldéhyde s'avère être globalement toxique pour les organismes aquatiques (selon la directive 93/21/CEE relative à la classification européenne des substances chimiques).

Dans ce travail, nous rapportons les effets éco-toxicologiques de la solution de glutaraldéhyde, sur une batterie de bio-essais : ,*'Carassius auratus'*, de laboratoire et son effet biocide sur des souches bactériennes.

Matériel et méthodes

Etude de la réactivité du Glutaraldehyde sur quelques souches microbiennes

La suspension bactérienne est obtenue par prélèvement de quelques colonies de bactéries ou de levures dans des tubes stériles de 15 mL contenant de l'eau physiologique sous agitation. La lecture de la densité optique (absorbance) est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre type Lambda EZ210 à une longueur d'onde de 620 nm pour les bactéries et 420 nm pour les levures. L'absorbance doit être comprise entre 0,22 et 0,32 pour les bactéries et entre 2 et 3 pour les levures, qui correspondent à une

concentration de 10^7 - 10^8 germes /mL. L'absorbance du mélange (germe + Glutaraldéhyde) est mesurée à une longueur d'onde de 620 nm pour les suspensions bactériennes et 420 nm pour les suspensions de levures pendant 20 minutes (le temps d'action du Glutaraldéhyde). Le tracé de l'absorbance en fonction du temps (0 à 20 minutes) montre l'effet du Glutaraldéhyde à 2% sur les souches testées. Le tableau 1 montre les caractéristiques des couches testées.

Caractéristiques de l'appareil de spectroscopie d'absorption Ultra violet – visible : Modele, Lambda EZ210 Spectrophotomètre; ROM Version, 2550 02; Measurement Type, Wavelength Scan; Data Mode, Abs; Starting Wavelength, 1100.0 nm ; Ending Wavelength, 190.0 nm ; Scan Speed, 1200 nm/min ; Sampling Interval, 1.0 nm ; Slit Width, 2 nm ; Lamp Change, 340.0 nm ; Baseline, System Correction ; Response , Fast ; Path Length, 10.0 mm; Method: Rectangular; Sensitivity, 1, Threshold, 0.0100.

Tableau 1 : Caractéristiques des souches testées:

Nom scientifique	Organisme	Gram	Référence	Source
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie	Gram +	ATCC 25923	I.P.A
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactérie	Gram +	ATCC 6633	I.P.A
<i>Escherichia. Coli</i>	Bactérie	Gram -	ATCC 25922	I.P.A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactérie	Gram -	ATCC 27853	I.P.A
<i>Candida albicans</i>	Levure	-	ATCC 2091	I.P.A

Antibiogramme

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

Revivification : La revivification des souches a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure. Elle consiste à ensemencer en stries quelques colonies de souches conservées à la surface de la gélose préalablement coulée et solidifiée dans des boîtes de pétri, Chapman pour *Staphylococcus aureus*, OGA (Gélose glucosée à l'oxytétracycline) pour *Candida albicans*, et GN (Gélose nutritive) pour *Pseudomonas aeruginosa*. Les boîtes de pétri renfermant chacune une souche microbienne, sont incubées à 37C° pendant 24 heures pour les bactéries et à 25C° pendant 48 heures , jusqu'à 5 jours , pour les champignons.

Ensemencement : Cette étape consiste à liquéfier d’abord, les milieux gélosés dans un bain marie à 95C° et les laisser refroidir. Ensuite, verser aseptiquement ces milieux dans des tubes stériles de 25 mL contenant 1 mL de la suspension microbienne et agiter les tubes manuellement par retournement. Puis verser 15 mL du mélange (milieu + suspension microbienne) dans les boîtes de pétri.

Séchage : Laisser sécher les boîtes pendant quelques minutes à température ambiante, puis les refermer.

Déposition des disques d’antibiotiques : Une fois le milieu est solidifié, prélever aseptiquement à l’aide d’une pince stérile, un disque absorbant stérile de 9 mm et l’imbiber de la solution de Glutaraldéhyde (2%), en mettant en contact uniquement la bordure du disque. Déposer les disques imbibés à la surface des milieux de culture, préalablement préparés, en appuyant légèrement sur le disque, pour assurer un contact uniforme avec le milieu de culture.

Incubation : Après avoir déposé les disques sur les milieux de culture, l’incubation des boîtes de pétri a été effectuée à 37C° pendant 24 heures pour les bactéries et 25C° pendant 48 heures à 5 jours pour les champignons et les levures.

Lecture : La lecture se fait en mesurant le diamètre des zones d’inhibition autour du disque à l’aide d’un pied à coulisse. L’interprétation des résultats se fait selon l’échelle d’estimation de l’activité antimicrobienne donnée par le fascicule de standardisation de l’antibiogramme à l’échelle nationale (6^{ème} édition, 2011). Les diamètres des zones d’inhibition de la croissance microbienne sont divisés en quatre classes.

- Non inhibitrice : diamètre de la zone d’inhibition < 10 mm;
- Légèrement inhibitrice : 10 mm < diamètre de la zone d’inhibition < 16 mm;
- Modérément inhibitrice : 16 mm < diamètre de la zone d’inhibition < 28 mm;
- Fortement inhibitrice : diamètre de la zone d’inhibition > 28 mm.

Détermination de la CL₅₀

“Carassius auratus” est un poisson d’eau douce, il appartient à la famille des “cyprinidae”; c’est un poisson résistant dont l’espérance de vie est de 30 ans. C’est une espèce facile à conserver en laboratoire. L’essai consiste à déterminer le pourcentage de mortalité, après une période d’exposition de 24 heures, dans des conditions contrôlées. Pour déterminer la CL₅₀ après 24 heures, une série de dilutions de l’échantillon (5, 10, 15 et 20 mL) du glutaraldéhyde (2%) est faite dans 2 L d’eau, qui contient le poisson rouge et cela pour différents poids du poisson. Les poissons sont conservés dans des vases en verre. Les vases sont lavés puis désinfectés à l’alcool,

ensuite rincés avec l'eau de l'échantillon et remplis au maximum. Chaque vase reçoit 02 poissons de mêmes taille et poids. L'analyse est effectuée à température ambiante 20 ± 2 °C. La figure N°1 montre le mode opératoire suivi.

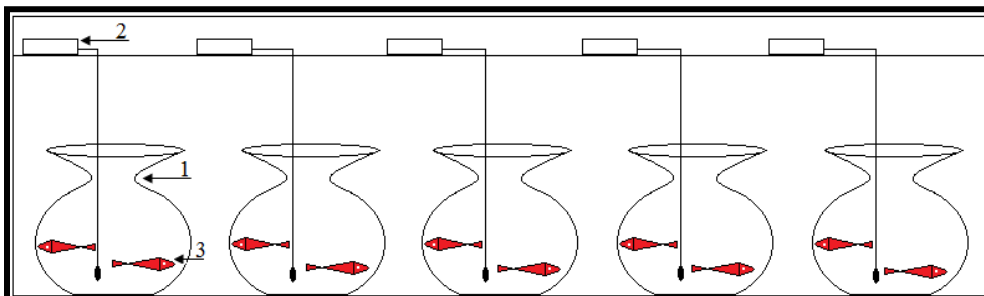


Fig. 1. Détermination de la CL₅₀ : 1.aquarium, 2.moteur d'agitation(source d'air/ oxygène), 3.Carassius auratus.

Résultats et discussion

Le résultat de l'absorbance respective des suspensions bactériennes et des levures sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2: Absorbance des suspensions bactériennes et levures.

Souches étudiées	Absorbance	Concentration UFC/mL
<i>Escherichia coli</i>	0,230	10^7 à 10^8
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,249	
<i>Bacillus subtilis</i>	0,303	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,213	
<i>Candida albicans</i>	2,1	

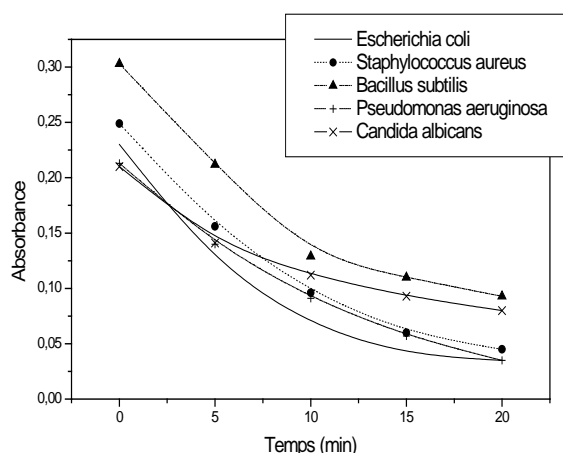


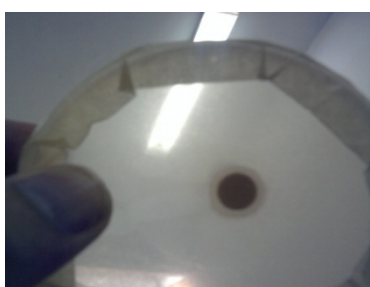
Fig. 2. Effet du Glutaraldéhyde sur les différentes souches microbiennes testées.

Le Glutaraldéhyde en solution (2%) (Anios France) comme désinfectant, montre une activité satisfaisante, par la méthode de mesure de la densité optique. Les mesures spectrales UV – Visible (figure 2) livrent

dans tous les cas, une variation exponentielle décroissante, soulignant avec force, le caractère biocide du 1,5 pentanal. À l'opposé de la technique de l'antibiogramme, les diamètres des zones d'inhibition qui dépendent uniquement de la sensibilité du germe, montrent une distance non significative, qui ne justifie pas la sensibilité des microorganismes au glutaraldéhyde dans notre cas (tableau 3, figure 3).

Tableau 3 : Diamètre de la zone d'inhibition de la solution de glutaraldéhyde 2%.

Les souches testées	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)				
	Test 1	Test 2	Test 3	Moyenne	
<i>Escherichia coli</i>	11,5	11,0	10,3	10,93	< 16
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,5	12,0	11,0	11,50	< 16
<i>Bacillus subtilis</i>	11,0	11,0	11,4	11,13	< 16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11,0	10,5	10,5	10,66	< 16
<i>Candida albicans</i>	12,0	11,0	12,5	11,83	< 16



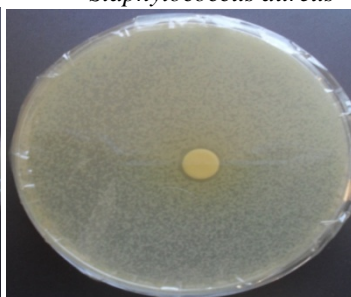
Escherichia coli



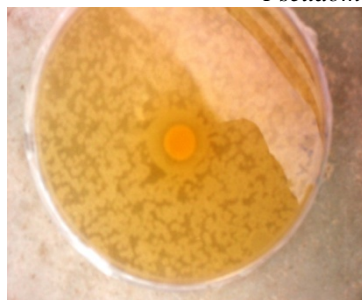
Staphylococcus aureus



Bacillus subtilis



Pseudomonas aeruginosa



Candida albicans

Fig. 3. Résultat du test de l'antibiogramme de la solution de glutaraldéhyde à 2%.

A partir de ces résultats, il apparait clairement que :

- *Escherichia coli* est résistante ($\Phi = 10,9\text{mm}$) ;
- *Pseudomonas aeruginosa* est résistante ($\Phi = 11,5\text{mm}$) ;
- *Staphylococcus aureus* est résistante ($\Phi = 11,1\text{mm}$) ;
- *Bacillus subtilis* est résistante ($\Phi = 10,5\text{mm}$) ;
- *Candida albicans* est résistante ($\Phi = 11,8\text{mm}$).

Les tests avec la méthode de l'antibiogramme, ne révèlent pas l'activité biocide du glutaraldéhyde. Les zones d'inhibition sont très proches entre elles, malgré la disparité entre les différents mécanismes de résistance, et entre les souches bactériennes, à savoir les bactéries Gram+ et les bactéries Gram-. Ces résultats peuvent être expliqués par l'influence de la température d'incubation sur la stabilité et l'efficacité du glutaraldéhyde. En effet (Migneault et al., 2004) ont rapporté que l'élévation de la température infère la polymérisation du glutaraldéhyde, ce qui induit une perte du pouvoir de réticulation avec les protéines. Boucher (1975) a montré que le glutaraldéhyde est un agent antimicrobien très efficace, à une température de 20°C. Cette contradiction apparente reste à étudier. Par ailleurs, la littérature rapporte que le Glutaraldehyde polymérise instantanément en solution. Les différents polymères du glutaraldéhyde, ont une bonne réticulation avec les protéines (Walt and Agayn, 1994). Le tableau suivant (4) et la figure 4 présentent les résultats expérimentaux obtenus pour le bio-essais. La courbe de concentration-effet du glutaraldéhyde, est modélisée à partir de ces derniers (tableau 4).

Tableau 4: Bio-essais du “*Carassius auratus*” dans la solution de glutaraldéhyde.

Poids (g)	CL ₅₀	Poids (g)	CL ₅₀	Poids (g)	CL ₅₀	Poids (g)	CL ₅₀
Bioessai N° 1 Solution GL (2%)		Bioessai N° 2 Solution GL (2%)		Bioessai N° 3 Solution GL (2%)		Bioessai N° 4 Solution GL (2%)	
60	0,50	200	0,75	300	1,05	400	1,10
70	0,50	210	0,75	310	1,05	410	1,10
80	0,50	220	0,75	320	1,05	420	1,10
90	0,50	230	0,75	330	1,05	430	1,10

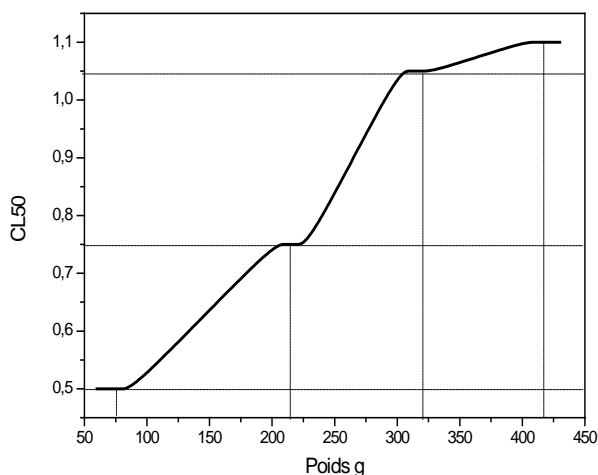


Fig. 4. Courbe concentration-effet de glutaraldéhyde sur ,“*Carassius auratus*”.

La LC_{50} en fonction du poids, met en exergue les méfaits du Glutaraldéhyde sur l'écosystème, notamment les eaux de surface. Entre 50 et 100 g, la CL_{50} est estimée à 0,5 de glutaraldéhyde à 2%; par contre entre 400 et 430 g, la CL_{50} est de 1,10. Ce constat souligne, la nuisance qui s'amortit avec le poids.

Conclusion

La stratégie d'élaboration d'une approche expérimentale, dans le but de caractériser les effets des solvants, produits physiologiques et médicaments s'impose, pour les contrôles de routine. L'approche "substance" comme dans notre cas le "Glutaraldéhyde", donne de bonnes estimations. Le Glutaraldéhyde s'avère écotoxique. La courbe "concentration – effet" montre que la toxicité est importante dans le cas de batteries de poissons, de faible poids.

References:

- Bouزيد M, Djadi A, Geuchtoulli S: Global Approach and Targeted Approach in the Management of Hospital Effluents. Journal of Materials Science and Engineering 2013; B 3 (4) 214-225.
- Monsan Pierre, Puzo Germain, Mazarguil Honoré. Etude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhyde-protéines. Biochimie 1975 ; 57, 1281-1292.
- Russell A. D, Hopwood D: The Biological Uses and Importance of Glutaraldehyde. Progress in Medicinal Chemistry 1976; 13, 271-297.

- Jayakrishnan A, Jameela S.R: Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery Matrices. *Biomaterids* 1996; 17, 471-484
- Migneault Isabelle, Dartiguenave Catherine, Bertrand Michel J, Waldron Karen C: Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* 2004; 37, 790-802.
- Okuda Keiko, Urabe Itaru, Yamada Yasuhiro, Okada Hirosuke: Reaction of Glutaraldehyde with Amino and Thiol Compounds. *Journal of fermentation and bioengineering* 1991; 71 (2) 100-105.
- Sano Larissa L, Krueger Ann M, Landrum Peter F: Chronic toxicity of glutaraldehyde: differential sensitivity of three freshwater organisms. *Aquatic Toxicology* 2005; 7, 283–296.
- Le Fol T, Vaillant C : Traitement des endoscopes : état de l’art et application au centre hospitalier universitaire d’Angers. *IRBM* 2009 ; 30, 292–301.
- Sano Larissa L, Moll Russell A, Krueger Ann M, Landrum Peter F: Assessing the Potential Efficacy of Glutaraldehyde for Biocide Treatment of Un-ballasted Transoceanic Vessels. *J. Great Lakes Res* 2003; 29 (4) 545–557.
- Power E. G. M, Russell A. D: Assessment of ‘Cold Sterilog Glutaraldehyde Monitor’. *Journal of Hospital Infection* 1988; 11, 376-380.
- Bonnard N, Brondeau M-T, fargot D, Malard S, Schneider O, Serre R: Fiche toxicologique glutaraldéhyde. FT 171, INRS, France, Edition 2010.
- Jolibois B, Guerbet M, Vassal S: Glutaraldehyde in hospital wastewater. *Archives of environmental contamination and toxicology* 2002; 42, 137-144.
- Leung Hon-Wing: Ecotoxicology of Glutaraldehyde: Review of Environmental Fate and Effects Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2001; 49, 26-39.
- Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques : Standardisation de l’antibiogramme à l’échelle nationale (Médecine humaine et vétérinaire) 2011 ; 6ème édition.
- Boucher, R.M.G: On biocidal mechanisms in the aldehyde series. *Canadian journal of pharmaceutical sciences* 1975; 10, 1-7.
- Walt David R, Agayn Venetka I: The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *trends in analytical chemistry* 1994; 13 (10) 425-430.